

Noémie MOLA PAQUEROLLES

Master 2 professionnel : Phytoressources

Evaluation de l'effet antibactérien d'extrait de bois d'inde (*Pimenta racemosa*) contre l'agent pathogène *Ralstonia solanacearum* responsable du flétrissement bactérien de la tomate, en zone tropicale humide de la Martinique



**Rapport de stage au Cirad-PRAM
Du 02-02-2012 au 13-08-2012**

Maître de stage : Péninna DEBERDT

Responsable du master : Gilles COMTE

Université Claude Bernard  Lyon 1

 **cirad**
LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
POUR LE DÉVELOPPEMENT

 **PRAM**
Centre de Recherche Agronomique
de la Martinique

Remerciements

Je remercie tout d'abord Mme Péninna Deberdt, docteur en bactériologie et chercheur phytopathologiste, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et permis de réaliser ce stage de six mois, pour la confiance qu'elle m'a témoignée et les conseils qu'elle m'a apportés ; et Mme Régine Coranson-Beaudu, technicienne du laboratoire en phytobactériologie, pour tout ce qu'elle m'a appris, pour sa patience et la liberté dont j'ai bénéficié. Merci également à tout le personnel du PRAM, par qui j'ai été si bien accueillie, et notamment les thésards, stagiaires et VSC, en particulier Sophie, Thiago, Aude et Sébastien qui ont rendu mon expérience en Martinique aussi agréable et riche en découvertes. Et enfin, mes pensées vont vers ma famille, qui m'a soutenue et permis de réaliser ce projet.

Résumé :

Le flétrissement bactérien est une des pathologies végétales les plus problématiques pour les cultures maraîchères, principalement dans les régions tropicales et subtropicales, à climat chaud et humide, et notamment à la Martinique. L'agent pathogène responsable de cette maladie, *Ralstonia solanacearum* est une bactérie particulièrement virulente qui s'attaque principalement aux solanacées. Dans le cadre de recherche de moyens de gestion du flétrissement bactérien, nous proposons ici de tester le pouvoir antibactérien d'un extrait végétal de bois d'inde (*Pimenta racemosa*). L'effet est testé sur la croissance *in vitro* de *R. solanacearum* par la technique de milieu amendé ; et *in vivo*, par suivi de populations de *R. solanacearum* dans un sol naturel amendé en huile essentielle, et par suivi de l'incidence du flétrissement bactérien par observation de symptôme sur tomate.

Les résultats montrent un effet antibactérien *in vitro* et *in vivo* de l'extrait végétal de bois d'inde sur *R. solanacearum*, et un effet supprimeur sur l'incidence de la maladie.

Ces résultats offrent d'intéressantes perspectives de lutte biologique contre le flétrissement bactérien. Cette étude pourra être poursuivie par des essais en champs.

Abstract:

Bacterial wilt is one of the most destructive diseases in horticulture and mainly in tropical and subtropical areas like Martinique. This disease is caused by *Ralstonia solanacearum*, bacteria strongly virulent for solanacea. Many researches are made to find way to reduce bacterial wilt and the purpose of this work is to test antibacterial power of *Pimenta racemosa* essential oil. Essential oil effect is tested *in vitro* by culture amendment assay and *in vivo* by monitoring, *R. solanacearum* populations in natural and amended soil, and disease impact in tomato.

Results show antibacterial effect of vegetal extract *in vitro* and *in vivo*, against *R. solanacearum* and suppressive effect on wilting incidence.

These results are given interesting perspective for controlling bacterial wilt and this work must be continued by field applications.

Liste des abréviations

CFU	« Colony Forming Unit » : colonie formant une unité
CIRAD	Centre de coopération International de Recherche Agronomique pour le Développement
CMI	concentration minimale d'inhibitrice
EA	extrait aqueux
HE	huile essentielle
IC	Indice de colonisation
IFB	Indice de flétrissement bactérien
JAI	Jour après inoculation
JAT	Jour après transplantation
ND	non disponible
PRAM	Pôle de Recherche Agroenvironnemental de la Martinique

Rs *Ralstonia solanacearum*

Tw Tween

Sommaire

Liste des figures et des tableaux	1
Introduction générale	2
Chapitre 1 :	
Synthèse bibliographique	4
1) Flétrissement bactérien en Martinique	4
2) Symptomatologie	4
3) Epidémiologie	5
1) <i>Ralstonia solanacearum</i> , agent pathogène responsable du flétrissement bactérien	5
a) Description	5
b) Classification	5
c) Plantes hôtes	6
3.2) Dissémination et survie de la bactérie	6
a) Les plantes hôtes, hôtes alternatifs et non hôtes	6
b) L'eau et le sol	6
c) Le matériel agricole	6
d) Cas particulier de l'état VBNC	6
4) Moyens de lutte et de prévention	7
4.1) Mesures prophylactiques	7
4.2) Pratiques culturales	7
4.3) Résistance variétale	7
5) Nouvelle perspective de lutte biologique : les biopesticides à partir d'extraits végétaux.....	7
Chapitre 2 :	
Etude du pouvoir antibactérien d'extraits de Bois d'Inde, contre l'agent pathogène <i>Ralstonia solanacearum</i>	9
I) Matériels et méthodes	9
A) Matériels	9
1) L'agent <i>Ralstonia solanacearum</i>	9
2) Le bois d'inde : <i>Pimenta racemosa</i>	10
3) La tomate cv. Roma	10
4) Le sol	10

B) Méthodes	11
1) Etude de l'effet d'huile essentielle de Bois d'Inde sur la croissance de <i>R. solanacearum</i> , à l'aide de la technique en milieu amendé : essai 1 in vitro	11
a) Le principe	11
b) Les traitements	11
c) Le mode opératoire	11
d) Les observations	11
e) Les analyses statistiques	11
2) Effet des extraits de bois d'inde sur la dynamique des populations de <i>R. solanacearum</i> et sur l'incidence du flétrissement bactérien de la tomate : essai 2 et 3 in vivo	12
2.1) Essai 2 : Suivi de populations de <i>R. solanacearum</i> dans un sol naturel	12
a) Le principe	12
b) Les traitements	12
c) Le mode opératoire	12
1) Traitement du sol	12
2) Extraction et quantification des populations bactériennes du sol	13
3) Détermination de la masse sèche des échantillons de sol	14
d) Les observations	14
e) Les analyses statistiques	14
2.2) Essai 3 : Etude du développement du flétrissement bactérien de la tomate, après traitement du sol, par des extraits de bois d'inde	14
a) Le principe	14
b) Les traitements	14
c) Le mode opératoire	15
d) Les observations	16
1) Suivi du développement des symptômes	16
2) Acquisition des données	16
e) Les analyses statistiques	16
II) Résultats	17
A) Essai 1	17
1) Essai 1.1	17
2) Essai 1.2	18
B) Essai 2	20
1) Dynamique des populations de <i>R. solanacearum</i> dans le sol	20
2) Dynamique des populations bactériennes totales dans le sol	21
C) Essai 3	23
1) Incidence du flétrissement bactérien	23
2) Sévérité du flétrissement bactérien	24
3) Indice de colonisation bactérienne	25
4) Cas du traitement en extrait aqueux	25
III) Discussion	26
IV) Conclusion	29
Bibliographie	29

Liste des figures et des tableaux

Figures :

Figure 1 : Plant de tomate atteint de flétrissement bactérien et plant sain	4
Figure 2 : Classification de <i>R. solanacearum</i> en « phylotypes » et en « sequevars », Fegan and Prior 2005	5
Figure 3 : Culture de <i>R. solanacearum</i> , souche 02-075, sur milieux SMSA	9
Figure 4 : Bois d'inde	10
Figure 5 : Semis de tomates cv. Roma	10
Figure 6 : Mode opératoire pour le traitement du sol, essai 2	13
Figure 7 : Mode opératoire d'extraction et de quantification de bactéries du sol	13
Figure 8 : Mode opératoire pour le traitement du sol et la transplantation de tomates	15
Figure 9 : dispositif en bloc (serre de phytopathologie du PRAM), essai 3	15
Figure 10 : Photo de colonies de <i>R. solanacearum</i> sur milieu amendé ou non en HE ; inoculation à 10^2 cfu/ml, essai 1.1	18
Figure 11 : Photo de colonies de <i>R. solanacearum</i> sur milieu amendé ou non en HE; inoculation à 10^3 cfu/ml, essai 1.2	19
Figure 12 : Suivi de la dynamique des populations de <i>R. solanacearum</i> , pendant 59 jours, en sols amendés avec différentes concentrations d'HE de bois d'inde, essai 2	20
Figure 13 : Suivi de la dynamique des populations bactériennes totales, pendant 59 jours, en sols amendés avec différentes concentrations en HE de bois d'inde	22
Figure 14 : Colonies bactériennes totales extraites, à 59 JAI, des sols de chaque traitement, essai 2	22
Figure 15 : Représentation de l'évolution du flétrissement bactérien pendant 28 jours, selon le traitement, en regroupant les 3 blocs, essai 3	23
Figure 16 : Plants de traitement HE 0.14%, HE 0.07%, HE 0.04%, témoin inoculé et non inoculé	24
Figure 17 : Représentation des AUDPC à 28JAT pour chaque traitement, essai 3	24
Figure 18 : Représentation des IFB et IC en fin d'essai, à 28 JAT, pour chaque traitement	25
Figure 19 : Photo de plant de tomate témoin et ayant reçu le traitement EA	25
Figure 20 : Etude de l'effet antibactérien d'extrait de bois d'inde selon les différentes composantes du système épidémiologique du flétrissement bactérien	26

Tableaux :

Tableau 1 : Résultats de l'analyse de variance ANOVA, essai 1.1	17
Tableau 2 : Valeur du nombre de cfu, pour chaque dose en HE, par répétition et par concentration en inoculum, essai 1.1	17
Tableau 3 : Test de tukey pour la concentration en inoculum à 10^2 cfu/ml, essai 1.1	17
Tableau 4 : Résultats de l'analyse de variance ANOVA, essai 1.2	18
Tableau 5 : Valeur du nombre de cfu, pour chaque dose en HE, par répétition et par concentration en inoculum, essai 1.2	19
Tableau 6 : Test de tukey pour la concentration en inoculum 10^3 cfu/ml, essai 1.2	19
Tableau 7 : Résultat de l'analyse de variance ANOVA en fin d'essai, à J59, essai 2.....	20
Tableau 8 : Test de tukey à J59, essai 2	21
Tableau 9 : Résultats de l'analyse de variance ANOVA en fin d'essai, à J59, essai 2	21
Tableau 10 : Test de tukey à J59, essai 2	22

Introduction générale

Le système agricole actuel, monoculturel, intensif et à haut rendement, nécessite l'apport d'intrants chimiques et une haute technicité. Ceci provoque un déséquilibre des écosystèmes, et une augmentation de l'incidence des maladies végétales. Ainsi, les pathogènes et ravageurs des végétaux causent des dégâts d'importance économique considérable dans le domaine agricole mondial ; chaque année les microorganismes phytopathogènes entraînent des pertes chiffrées en millions de dollars. Les dégâts occasionnés par les agents phytopathogènes font alors l'objet de préoccupations planétaires, avec la mobilisation des scientifiques et des agriculteurs pour la recherche de solutions d'éradication et de contrôle des maladies.

L'agent phytopathogène étudié pendant mon stage, *Ralstonia solanacearum*, est la bactérie responsable du flétrissement bactérien. Cette maladie est extrêmement destructrice pour les cultures maraîchères, et ceci à échelle mondiale, avec un caractère particulièrement problématique dans les zones tropicales et subtropicales (Pradhanang et al, 2003 ;Denny, 2006). En Martinique, *R. solanacearum* sévit sur un large spectre d'hôtes et notamment sur les espèces de la famille des Solanacées, et plus récemment sur Cucurbitacées (Wicker et al, 2007).

Il apparaît urgent de trouver des solutions pour lutter durablement contre le flétrissement bactérien, sans augmenter le coût environnemental et en rassurant les agriculteurs et les consommateurs. C'est pourquoi on observe un regain d'intérêt pour la lutte biologique, définie par l'OILB (Organisation Internationale de Lutte Biologique) comme l'utilisation d'organismes vivants (animaux ou végétaux) pour prévenir ou réduire les dégâts causés par les ravageurs et agents pathogènes (Jijakli, 2003). De nombreuses recherches sont effectuées afin de comprendre les mécanismes naturels de lutte, résultats d'interactions biotiques et abiotiques complexes au sein du pathosystème, englobant la plante hôte, l'agent pathogène, la microflore associée et les caractéristiques physico-chimiques environnementales.

Mon sujet de stage s'insère dans cette problématique, en s'intégrant d'une part, dans l'axe A « Agroécologie, Interactions et Régulations Biologiques dans les systèmes horticoles » (AIRB) du projet scientifique de l'UR Hortsys du CIRAD et d'autre part, dans le projet de recherche du PRAM « Conception de systèmes de cultures innovants à faibles impacts environnementaux ».

La thématique développée porte sur l'intérêt du pouvoir antibactérien d'extraits végétaux pour lutter contre le flétrissement bactérien de la tomate en Martinique.

Les travaux réalisés précédemment, au sein du laboratoire de phytopathologie du PRAM ont montré que certains extraits végétaux expriment un effet antimicrobien vis-à-vis de *R. solanacearum* *in vitro* (Deberdt et al, 2012). Dans le cadre de mon stage, nous nous intéressons aux extraits de bois d'inde, sous forme d'huile essentielle et d'extraits aqueux. En effet, des travaux préliminaires ont déjà révélés un effet antibactérien de l'huile essentielle de bois d'inde sur la croissance *in vitro* de *R. solanacearum* (Laure 2012).

Mon stage permet la poursuite de ces travaux par la réalisation d'essais complémentaires *in vitro* et la mise en place d'essais *in vivo*. Ces recherches permettront (i) de valider l'effet antibactérien d'extrait de bois d'inde sur la croissance *in vitro* de *R. solanacearum*, (ii) d'évaluer leur impact sur la population de *R. solanacearum* dans le sol, et (iii) sur l'incidence

du flétrissement bactérien de la tomate, afin de mieux comprendre les mécanismes d'action impliqués.

Le premier chapitre de mon rapport est consacré à une recherche bibliographique, apportant tout d'abord un aperçu de la situation des cultures maraîchères face au flétrissement bactérien en Martinique, puis une description de l'agent pathogène et de la maladie, ainsi qu'une rapide synthèse des travaux effectués sur le pouvoir antibactérien d'extraits végétaux.

Le deuxième chapitre est constitué de trois parties qui présentent les essais réalisés durant mon stage.

L'essai 1 permet l'étude de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle de bois d'inde sur la croissance *in vitro* de *R. solanacearum* à l'aide de la technique en milieu amendé.

Deux autres essais *in vivo* sont également conduits (essai 2 et 3). L'essai 2, réalisé en chambre climatique, étudie l'effet de l'amendement de sol naturel en huile essentielle de bois d'inde, sur la dynamique des populations de *R. solanacearum* du sol. L'essai 3, réalisé en serre, permet d'évaluer l'effet du traitement du sol avec deux types d'extrait de bois d'inde sur l'incidence du flétrissement bactérien de la tomate.

Chapitre 1:

Recherche bibliographique

Les maladies bactériennes sont des problèmes majeurs pour les cultures horticoles, en champs comme en serre. Le flétrissement bactérien représente un enjeu capital pour les cultures maraîchères à l'échelle mondiale et en particulier à la Martinique. La recherche bibliographique présentée ci-dessous donne une description du flétrissement bactérien et de l'agent causal, *R. solanacearum*. Puis un bilan des travaux de recherches sur le pouvoir antibactérien d'extraits végétaux et le développement de biopesticides est dressé.

1) Le flétrissement bactérien en Martinique

En Martinique, le flétrissement bactérien a été rapporté pour la première fois en 1960 sur des plants de tomates (Digat et Escudié, 1967). Depuis 1999, une population émergente de *R. solanacearum* a été mise en évidence en Martinique (Wicker *et al*, 2007). Cette nouvelle population, plus agressive sur les solanacées que la population historique, a élargi son spectre d'hôtes aux Cucurbitacées et à l'*Anthurium* sp.

Le climat tropical et les pratiques agricoles qui y sont associées favorisent la maladie. En effet, concernant la culture de la tomate en Martinique, trois à quatre cycles peuvent être réalisés sur une même parcelle au cours d'une seule année, ce qui entraîne un établissement durable des populations de *R. solanacearum* (Renarzewski, 2006).

2) Symptomatologie

L'agent *R. solanacearum* présent dans la rhizosphère pénètre la plante via le système racinaire et colonise peu à peu tout le système vasculaire, provoquant une déshydratation systémique. Les symptômes de la maladie se développent progressivement et plus ou moins rapidement selon le végétal hôte et les conditions environnementales. On observe d'abord un flétrissement de l'appareil végétatif, avec une épinastie foliaire ; les feuilles flétries restent vertes (figure1). Les vaisseaux brunissent. Au niveau du collet, lieu de prolifération bactérienne, la tige peut aussi noircir. La maladie conduit à la mort de la plante.



Figure1 : Plant de tomate atteint de flétrissement bactérien (gauche) et plant sain (droite)

L'infection est favorisée par la présence de blessures racinaires, qui peuvent être dues aux pratiques culturales, aux animaux, aux insectes ou aux nématodes phytopathogènes telluriques. Ainsi, la présence combinée de nématodes du genre *Meloidogyne*, et de *R. solanacearum* augmente fortement la sensibilité de la plante au flétrissement bactérien (Pingsheng et al, 2007).

3) Epidémiologie

3.1) *Ralstonia solanacearum*, agent pathogène responsable du flétrissement bactérien

a) Description

L'agent *R. solanacearum* est responsable du flétrissement bactérien. C'est une bactérie tellurique, de type Gram négatif, à métabolisme aérobie et appartenant aux β protéobactéries. Elle est flagellée, en forme de bâtonnet avec une taille moyenne de un micron.

b) Classification

De nombreuses classifications du genre *Ralstonia*, de la famille *Burkholderia*, ont été proposées dans la littérature. Chronologiquement, la classification en race a été définie selon la gamme d'hôte, les biovars selon des critères morphologiques et physiologiques, et les phylotypes sur détermination génétiques (Lebeau, 2010).

La classification en phylotypes, établie par Fegan et Prior (2005) est celle qui représente le mieux la diversité génétique complexe de *R. solanacearum*. Le phylotype est défini par le niveau de polymorphisme de séquences génétiques cibles. Quatre phylotypes (I à IV), isolés sur différents continents, ont été distingués et divisés en sequevars (figure 2).

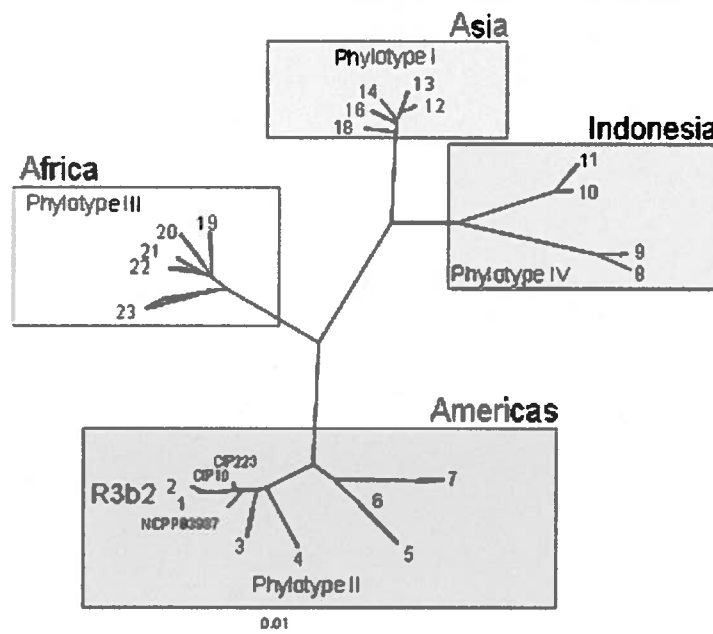


Figure 2 : Classification de *R. solanacearum* en « phylotypes » et en « sequevars », (Fegan and Prior, 2005)

En Martinique, Prior et Steva déterminent en 1990 que *R. solanacearum* est principalement représentée par le phylotype I sequevars 3, et par une minorité de phylotype II sequevar 3. En 1999, une nouvelle souche de *R. solanacearum* a été isolée sur anthurium. Il s'agit de la souche émergente classée phylotype II sequevar 4NPB (non pathogène sur bananier). Les souches de cette population ont été retrouvées sur Solanacées, et ont élargi leur spectre d'hôtes aux Cucurbitacées. L'origine de cette souche est encore inconnue (Wicker et al, 2007).

c) Plantes hôtes

L'agent *R. solanacearum* infecte un large spectre d'hôtes (200 espèces et 50 familles), et notamment des espèces horticoles d'importance majeure de la famille des solanacées comme la tomate, l'aubergine, la pomme de terre et le tabac mais aussi, le gingembre ou le bananier.

En Martinique, les souches de la population émergente de *R. solanacearum*, phylotype II sequevar 4NPB, sévit sur les Solanacées, les Cucurbitacées et l'anthurium. De plus, malgré le caractère non pathogène de ces souches sur bananier, les souches peuvent infecter les bananiers plantains, sans développement de symptômes typiques du flétrissement bactérien (Wicker et al, 2007).

3.2) Dissémination et survie de *R. solanacearum*

a) Les plantes hôtes, non hôtes et hôtes alternatifs

Les débris de végétaux infectés par *R. solanacearum*, et conservés dans le sol permettent la survie de la bactérie dans une parcelle agricole.

Certaines plantes, dites porteuses saines ou hôtes alternatifs, sont infectées par la bactérie sans pour autant présenter de symptômes du flétrissement bactérien. Ces plantes, principalement des adventives, permettent la survie de la bactérie entre deux périodes de cultures.

La bactérie peut également survivre en colonisant la rhizosphère de plantes non hôtes (Granada et Sequeira, 1983).

b) L'eau et le sol

La viabilité dépend très fortement des conditions physico-chimiques environnementales comme l'humidité, la température, ou le contenu en matière organique du sol. En effet, la population bactérienne peut être réduite par de fortes variations osmotiques, ou par des pH et températures extrêmes (Denny, 2006). La maladie peut aussi apparaître dans une zone inondée (Pradhanang et al, 2003).

c) Le matériel agricole

L'agent *R. solanacearum* peut se conserver sur le matériel agricole souillé et ainsi être transmis d'une parcelle à une autre. Ceci peut être évité par une désinfection systématique des outils, machines et vêtements.

d) Cas particulier de l'état VBNC

R. solanacearum peut également, lors de conditions défavorables, se trouver dans un état VBNC (viable but not culturable), une forme de résistance, encore peu connue. La

bactérie survie sans se multiplier, son métabolisme reste actif et la colonisation reprend dès le retour de bonnes conditions (Denny, 2006). Cette forme implique une croissance bactérienne trop faible pour être détectée sur milieu de culture (Grey and Steck, 2001). Cette forme de résistance peut être induite par un stress osmotique, thermique, nutritif ou encore par l'exposition à des métaux lourds (Gauthier, 2000).

4) Moyens de prévention et de lutte

4.1) Mesures prophylactiques

Les mesures prophylactiques peuvent empêcher, retarder l'apparition ou éviter la diffusion de la maladie sur une parcelle. Les dispositions préconisées sont, l'utilisation de semences saines, la désinfection du matériel agricole, le brûlage des déchets, le désherbage régulier, l'arrachage et la destruction des plants contaminés, et un bon drainage des sols (Mian *et al*, 2002).

4.2) Pratiques culturales

La rotation de cultures est un moyen de lutte efficace mais est souvent difficile à mettre en place car la période de rotation doit être de plusieurs années pour être efficace (Hunter 2009).

Des plantes à potentiel assainissant peuvent également être utilisées. On qualifie d'assainissante, une plante qui entraîne une diminution de la population de microorganismes phytopathogènes et du pouvoir infectieux sans impacter la plante cultivée. Selon la plante sélectionnée, différentes méthodes d'applications peuvent être mise en place, comme l'utilisation d'extraits, l'amendement du sol par enfouissement ou mulch, l'association ou encore la rotation culturale.

La mise en place de pratiques culturales innovantes, intégrant l'association culturale avec des espèces assainissantes ou encore l'utilisation d'amendements organiques, sont des pistes prometteuses pour la gestion durable du flétrissement bactérien.

4.3) Résistance variétale

L'utilisation de variétés résistantes ou tolérantes est également un moyen efficace, mais ces plantes peuvent présenter des infections latentes et permettre la survie de *R. solanacearum* (Felix *et al*, 2010). De plus, la diversité et la complexité génétique de la bactérie rend les cultivars résistants très spécifiques à un lieu associé à un climat, une pédologie et une souche bactérienne donnée.

La combinaison de mesures prophylactiques, de pratiques culturales innovantes et de variétés résistantes devraient permettre un contrôle durable de la maladie (Pradhanang *et al*, 2003 ; Roberts and Lohrke, 2003).

5) Nouvelle perspective de lutte biologique : les biopesticides à partir d'extraits végétaux

Le manque de résultats concluants pour la gestion du flétrissement bactérien par les diverses méthodes classiques, comme la création d'hôtes résistants, le contrôle culturel ou encore la lutte chimique, initie la recherche vers d'autres alternatives. S'insérant au cœur de cette problématique, plusieurs travaux de recherche d'extraits végétaux aux pouvoirs antibactériens ont été réalisés.

5.1) Les extraits végétaux et l'effet antimicrobien

Le pouvoir préventif ou curatif des végétaux et extraits végétaux contre les pathologies et maux du corps humain est reconnu depuis des millénaires. En médecine chinoise traditionnelle, les feuilles, les racines ou encore les fruits de certains végétaux sont toujours utilisés contre différents types d'infection. Les extraits végétaux sont utilisés en friction, inhalation, infusion, ingestion de tout ou partie d'un végétal ou par isolation d'un principe actif en phytothérapie et par la médecine actuelle. Chaque espèce ou organe végétal à ses propres propriétés en fonction de la constitution chimique. Celle-ci varie selon l'âge, les conditions environnementales ou encore les modes d'extractions et d'applications (Negi et al, 2002).

Les effets curatifs prouvés contre les agents pathogènes humains et les travaux en cours pour découvrir de nouveaux principes actifs, s'étendent à la recherche agronomique.

En effet les extraits végétaux ont montré leur effet antimicrobien, et notamment contre les bactéries phytopathogènes offrant ainsi des perspectives d'élaboration de biopesticides d'origine végétale (Freitas et al, 2000 ; Pradhanang et al, 2003 ; Balestra et al, 2008 ; Balestra et al, 2009 ; Abo-Elyousr and Asran 2009 ; Teng et al, 2010 ; Paret et al, 2010 ; Deberdt et al, 2012).

Différents types d'extraits végétaux peuvent être synthétisés, selon le végétal, l'organe végétal et le mode de synthèse. Ainsi, des extraits de type aqueux, huiles essentielles ou organiques peuvent être réalisés.

Plusieurs études ont montré le pouvoir antimicrobien d'extraits végétaux, contre des bactéries ou champignons phytopathogènes.

Pour tester, *in vitro*, l'effet antibactérien d'extraits végétaux, différentes méthodes sont proposées et le plus souvent ce sont les techniques de diffusion sur milieux solides (Vasinauskiene et al, 2006 ; Teng et al, 2009 ; Paret et al, 2010) qui sont utilisées.

L'effet des extraits végétaux en conditions *in vivo*, permet de tester l'effet, sur la bactérie dans son milieu naturel, et sur le développement de la maladie sur la plante hôte sensible. Différents moyens d'application de l'extrait végétal à tester peuvent être réalisés, l'amendement au sol (Deberdt et al, 2011 ; Pradhanang et al, 2003), la vaporisation sur parties aériennes de la plante, ou l'injection dans la tige de la plante ou à sa base.

Par ces techniques, différents extraits végétaux ont montré un effet antibactérien sur *R. solanacearum*, l'huile essentielle de *Spirea alpina* (Teng et al, 2010), l'huile essentielle de *Cymbopogon martini* (Paret et al, 2010) ou encore l'extrait aqueux d'*Allium fistulosum* (Deberdt et al, 2012).

Chapitre 2 :

Etude du pouvoir antibactérien d'extraits de bois d'inde, contre l'agent pathogène *Ralstonia solanacearum*

I) Matériels et méthodes

A) Matériel

Le matériel présenté ci-dessous est commun aux 3 essais réalisés durant mon stage.

1- L'agent *Ralstonia solanacearum*

La souche 02-075, souche de référence du laboratoire de phytopathologie, appartenant au phylotype II/sequevar 4NPB (non pathogène sur bananier), est utilisée dans notre étude. Cette souche a été isolée en Martinique, en 2002, sur un baliser et on la retrouve aujourd'hui dans la plupart des zones de production maraîchères de l'île (Wicker et al, 2007).

L'agent *R. solanacearum* est cultivé sur milieu semi-sélectif SMSA ou sur milieu non sélectif CPG (casamino acide peptone glucose); les colonies typiques de *R. solanacearum* sont de forme irrégulière et d'aspect muqueux (figure 3).



L'inoculum de *R. solanacearum* utilisé pour cette étude est calibré à 10^8 cfu/ml à l'aide d'un dosage spectrophotométrique (à 600nm), puis des dilutions en séries sont réalisées pour obtenir les concentrations souhaitées.

Figure 3 : Culture de *R. solanacearum*, souche 02-075, sur milieux SMSA

2- Le bois d'inde : *Pimenta racemosa* (figure 4)

Bien qu'il soit appelé Bois d'Inde, cet arbre est originaire des Antilles ; Christophe Colomb le nomma ainsi, pensant se trouver en Inde.

C'est un arbre commun en Martinique, on le trouve dans les forêts mais également proche des habitations. De nombreuses propriétés sont reconnues à cette espèce, notamment grâce aux feuilles très odorantes, qui sont utilisées en cuisine ou en phytothérapie, en infusions ou en frictions.



Figure 4 : Bois d'inde

Classification:

Ordre: Myrtales

Famille: Myrtaceae

Genre: Pimenta

Espèce: *P. racemosa*

Deux types d'extraits de feuilles de bois d'inde sont utilisés dans cette étude, l'huile essentielle (HE) et l'extrait aqueux (EA). L'huile essentielle est fabriquée par le Lycée d'enseignement Polyvalent du Lorrain (Martinique).

3- La tomate cv. Roma:

La variété de tomate « Roma », variété sensible au flétrissement bactérien, a été choisie pour l'étude (figure 5).



Figure 5: Semis de tomates cv. Roma

Classification:

Ordre: Solanales

Famille: Solanaceae

Genre: Solanum

Espèce: *S. lycopersicum*

4- Le sol

Le sol utilisé est un sol naturel provenant de la couche superficielle (15 premiers cm) d'une parcelle de la station de Rivière Lézarde (Martinique), naturellement infestée par l'agent *R. solanacearum*.

B) Méthodes

1-Etude de l'effet d'huile essentielle de bois d'inde sur la croissance de *R. solanacearum*, à l'aide de la technique en milieu amendé : essai 1 in vitro

a) Le principe

La technique de culture bactérienne sur milieu amendé est utilisée ici afin d'estimer la capacité de *R. solanacearum* à se multiplier sur un milieu de culture en contact direct d'HE. Différentes concentrations en HE sont testées afin de déterminer la CMI (concentration minimale inhibitrice).

b) Les traitements

Cinq traitements, quatre concentrations d'amendement en HE et un témoin, sont testés :

- Traitement 1 : (HE + Tween) à 0.01%
- Traitement 2 : (HE + Tween) à 0.02 %
- Traitement 3 : (HE + Tween) à 0.03 %
- Traitement 4 : (HE + Tween) à 0.04 %
- Traitement 5 (témoin positif inoculé) : (Eau + Tween)

Pour chaque traitement, trois concentrations en inoculum de *R. solanacearum* sont testées : 10^3 , 10^2 , 10^1 cfu/ml.

c) Le mode opératoire

L'huile essentielle est émulsionnée dans du Tween 20 (ratio 1:1). Au préalable, le Tween 20 a été stérilisé à 120°C pendant 20min, et l'HE a été stérilisée par filtration à 0.2mm. Des dilutions sont réalisées pour obtenir les concentrations à tester. Le mélange HE et Tween est incorporé dans le milieu de culture SMSA en surfusion. L'émulsion HE et Tween permet une incorporation plus homogène dans le milieu de culture.

Une première gamme de concentrations en HE est réalisée avec les traitements 1, 2, 4 et 5 (**essai 1.1**) ; puis une deuxième gamme avec les traitements 2, 3, 4 et 5 (**essai 1.2**).

Les milieux amendés sont coulés en boîte de pétri etensemencés à l'aide de 100µL de chaque concentration en inoculum de *R. solanacearum*. Pour chaque traitement, 3 séries sont réalisées par concentration en inoculum ; les deux gammes de concentration en milieu amendé sont répétées 3 fois.

d) Les observations

Les résultats sont obtenus par comptage du nombre de colonie de *R. solanacearum* sur milieu amendé après incubation 3 jours à 28°C, et sont exprimés en nombre de cfu de *R. solanacearum* par boîte de pétri.

e) Les analyses statistiques

Le nombre de cfu est transformé en log (cfu+1) afin de normaliser les données, puis une analyse de variance ANOVA suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey sont réalisés à l'aide du logiciel XLSTAT 2011.

2- Effet d'extraits de bois d'inde sur la dynamique des populations de *R. solanacearum* et sur l'incidence du flétrissement bactérien de la tomate : essais 2 et 3, in vivo

Deux essais *in vivo* sont mis en place de façon parallèle. Le sol est traité de la même manière pour les deux essais, il est préalablement séché à température ambiante pendant une semaine, tamisé à l'aide d'un tamis de 5 mm et humidifié afin d'être en condition optimale pour la croissance de l'agent *R. solanacearum* et donc au développement du flétrissement bactérien.

On réalise un suivi de populations bactériennes dans le sol en l'absence de tomates pour l'**essai 2**, et on observe le développement du flétrissement bactérien sur la tomate pour l'**essai 3**.

Pour l'**essai 2**, un seul type d'extrait de Bois d'Inde, l'huile essentielle (HE,) est testé, et pour l'**essai 3**, deux types d'extraits, huile essentielle (HE) et extrait aqueux (EA) sont testés.

2.1) Effet d'huile essentielle de bois d'inde sur la dynamique des populations de *R. solanacearum* dans un sol naturel : **essai 2**

a) Le principe

Le suivi de la dynamique des populations de *R. solanacearum* est réalisé sur un sol naturellement infesté, artificiellement contaminé par *R. solanacearum*, et préalablement traité avec différentes concentrations en HE de bois d'inde. Le suivi est effectué par extraction et quantification des populations de *R. solanacearum* du sol.

L'extraction et la quantification sont réalisées sur une période de 2 mois, à huit dates successives, J0 (avant traitement du sol), J3 (3 jours après traitement du sol), J10, J21, J36, J44, J52 et J59.

b) Les traitements

Quatre traitements, trois concentrations en HE et un témoin, sont testés.

- Traitement 1 : *R. solanacearum*, (HE + Tween) à 0.14%
- Traitement 2 : *R. solanacearum*, (HE + Tween) à 0.07%
- Traitement 3 : *R. solanacearum*, (HE + Tween) à 0.04%
- Traitement 4 : (témoin positif inoculé) : *R. solanacearum*, (eau + Tween)

L'inoculum de *R. solanacearum* utilisé est calibré à 10^8 cfu/ml.

c) Le mode opératoire

1) Le traitement du sol (figure 6)

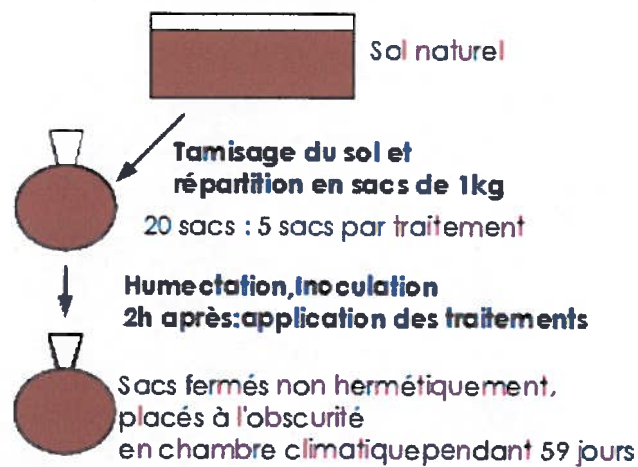


Figure 6 : Mode opératoire pour le traitement du sol

2) Extraction et quantification des populations bactériennes du sol (figure 7)

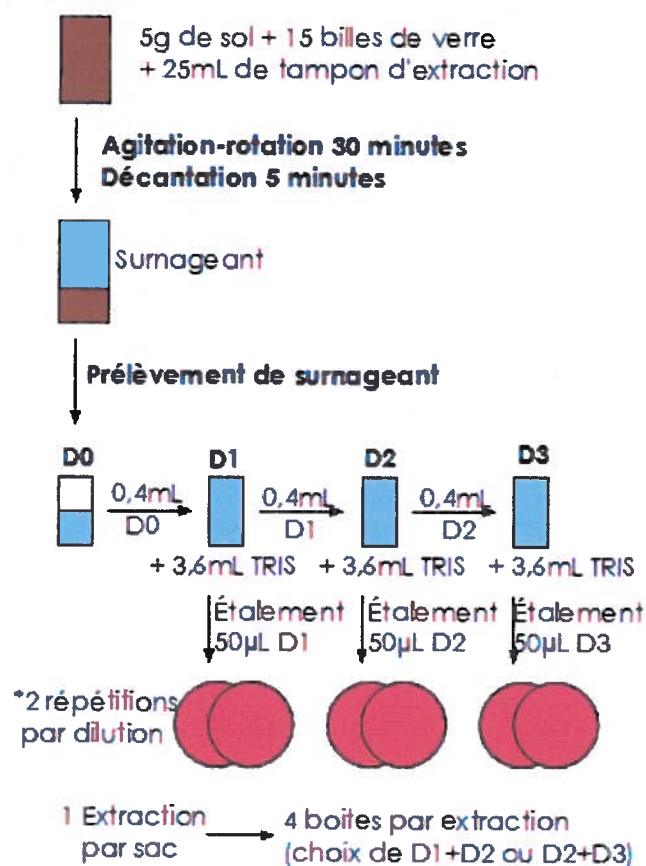


Figure 7 : Mode opératoire d'extraction et de quantification de bactéries du sol
D0, D1, D2 : dilutions successives de facteur 10

Pour chaque traitement, 5 répétitions, correspondant à 5 sacs de sol, sont réalisées. Par extraction, deux dilutions sont réalisées et chaque dilution est étalée sur deux boîtes de pétri, correspondant à 2 séries.

3) Détermination de la masse sèche des échantillons de sol

Pour chaque sac, 2x10g de sol frais sont prélevés et pesés, afin de déterminer, après séchage 24h à 120°C au four Pasteur, le poids sec de chaque échantillon. Ceci permet de calculer la teneur en eau du sol, et d'exprimer les résultats en nombre de cfu total par gramme de sol sec.

d) Les observations

Après incubation 3 à 4 jours à 28°C, le comptage du nombre total de colonies bactériennes (en cfu) et du nombre de colonies de *R. solanacearum* (en cfu) est réalisé. Les résultats sont ensuite exprimés en nombre de cfu de bactéries totales/g de sol sec et de *R. solanacearum*/g de sol sec.

e) Les analyses statistiques

Le nombre de cfu de *R. solanacearum* /g de sol sec est transformé en log cfu/g de sol sec afin de normaliser les données. Une analyse de variance ANOVA et un test de comparaison multiple de Tukey sont réalisés sur les données transformées à l'aide du logiciel XLSTAT 2011.

2.2) Effet de deux types d'extrait de bois d'inde sur l'incidence du flétrissement bactérien de la tomate : **essai 3**

a) Le principe

L'étude de l'effet des extraits végétaux sur l'incidence de la maladie est réalisée par observation des symptômes du flétrissement bactérien sur tomate après amendement du sol en extraits de bois d'inde, huile essentielle et extrait aqueux, à différentes concentrations.

b) Les traitements

- **Huile essentielle, HE** : Trois traitements en HE, et deux témoins sont appliqués

Traitement 1: *R. solanacearum*, (HE + Tween) à 0.04%

Traitement 2: *R. solanacearum*, (HE + Tween) à 0.07%

Traitement 3: *R. solanacearum*, (HE + Tween) à 0.14%

Traitement 4 : (témoin positif inoculé): *R. solanacearum*, (eau + Tween)

Traitement 5 : (témoin négatif non inoculé) : (eau + Tween)

- **Extraits aqueux, EA** : Un traitement en EA et deux témoins sont appliqués

Les extraits aqueux sont obtenus à partir de feuilles fraîches rincées, séchées et découpées en petits morceaux puis broyées dans un volume d'eau stérile au blender. Le mélange obtenu est filtré à travers une double couche de compresses stériles.

Traitement 6: *R. solanacearum*, EA à 50%

Traitement 7: (témoin positif inoculé): *R. solanacearum*, eau

Traitement 8: (témoin négatif non inoculé) : eau

L'inoculum de *R. solanacearum* utilisé est calibré à 10^8 cfu/ml

c) Le mode opératoire (figure 8)

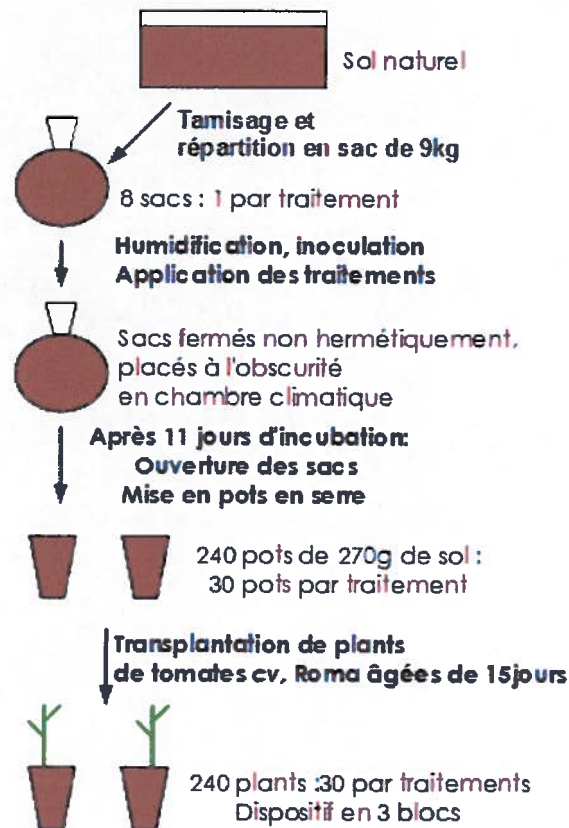


Figure 8: Mode opératoire pour le traitement du sol et la transplantation de tomates

Trois répétitions sont réalisées et organisées en trois blocs, disposés sur des tables indépendantes. Chaque bloc contient les 8 traitements. Les traitements, constitués de 10 pots, sont disposés sur des plateaux séparément. Les plateaux (correspondant aux traitements) sont ensuite distribués de façon aléatoire sur une table (correspondant à un bloc) (figure 9).

Les pots sont arrosés quotidiennement afin d'obtenir des conditions optimales au développement du flétrissement bactérien.



Figure 9: Dispositif en bloc (serre de phytopathologie du PRAM)

d) Les observations

1) Suivi du développement des symptômes

La notation des symptômes est réalisée 3 fois par semaine de 0 à 28 JAT (Jours Après Transplantation) selon l'échelle suivante :

1 = plante morte de flétrissement bactérien, entièrement flétrie ou aux trois quarts flétrie

0 = pas de symptôme

2) Acquisition des données

Le nombre de plants flétris à une date t permet l'évaluation de l'incidence de la maladie dont l'évolution au cours du temps représentée par la courbe $IFB=f(t)$ avec pour chaque date (t) le calcul de l'indice de flétrissement bactérien (IFB) :

$IFB(t) = \text{nb de plantes atteint de flétrissement bactérien à la date } t / \text{nb de plantes totales}$

Les données des IFB à différentes dates permettent l'évaluation de la sévérité de la maladie à ces mêmes dates grâce au calcul de l'indice AUDPC :

$$AUDPC(t_k) = \sum (IFB_i + IFB_{i+1}) (t_{i+1} - t_i) / 2$$

Isolements microbiologiques :

Durant les 28 jours de suivi des symptômes, des extractions bactériennes, au niveau du collet, sont réalisées sur les plants flétris, afin de confirmer la présence de *R. solanacearum*.

En fin d'expérimentation, 28 jours après transplantation des tomates (JAT), les extractions sont réalisées sur tous les plants sans symptômes, afin de déterminer si les tomates présentent ou non une infection latente.

Le nombre de plants sans symptômes, présentant une infection latente, en fin d'expérimentation permet l'évaluation de l'indice de colonisation, IC :

$$IC = (\text{nb de plantes flétries} + \text{nb de plantes sans symptôme avec infection latente}) / \text{nb de plantes totales}$$

e) Les analyses statistiques

Les indices de flétrissement bactérien (IFB), et indices de colonisation (IC), exprimés en % puis en proportion de plants flétris sont transformés en arc sinus ($\text{racine}(\text{IFB})$) et arc sinus ($\text{racine}(\text{IC})$) ; les valeurs AUDPC sont transformées en $\text{racine}(\text{AUDPC})$, afin de normaliser les données. Une comparaison de variance ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Tukey sont ensuite réalisés.

II) Résultats

A) Essai 1

1.1-Essai 1.1

91.8% de la variabilité exprimée est expliquée par le modèle (ANOVA, $R^2=0.918$). L'analyse de variance ANOVA montre un effet significatif de la concentration en HE testée et de la concentration en inoculum (ANOVA, $p<0.01$) (tableau 1).

Source	DDL	Σ des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F	Différence significative
série	2	0.038	0.019	0.193	0.825	Non
Répétition	2	0.693	0.347	3.500	0.036	Non
Concentration	3	18.568	6.189	62.502	< 0.0001	Oui
Concentration de l'inoculum	2	47.150	23.575	238.068	< 0.0001	Oui

Tableau 1: résultat de l'analyse de variance ANOVA

L'effet « série » n'étant pas significatif, les résultats des trois séries sont regroupés (tableau 2). Les traitements, pour chacune des trois concentrations en inoculum, se distinguent en trois groupes statistiquement différents (Test de Tukey, $p<0.05$). Le tableau 3 présente les résultats du test de comparaison multiple de Tukey pour la concentration en inoculum de 10^2 cfu/ml.

Inoculum (CFU/mL)	Concentration en HE			Témoin Tween
	0,01	0,02	0,04	
Répétition 1				
10 ³	164,3333	142,6667	0	166,3333
10 ²	18	10,66667	0	15,33333
10 ¹	0,666667	0,666667	0	1
Répétition 2				
10 ³	157,6667	69	ND*	151
10 ²	19	6	0	20
10 ¹	1	0,666667	0	2
Répétition 3				
10 ³	160	125	0	154,3333
10 ²	14,33333	11,66667	0	17,33333
10 ¹	1,333333	0	0	1,333333

Tableau 2: Valeur du nombre de cfu, pour chaque concentration en HE, par répétition et par concentration en inoculum (*ND = non déterminé)

Concentration en HE	Moyenne estimée	Groupes
0	1,262	A
0,01	1,245	A
0,02	0,981	B
0,04	0,000	C

Tableau 3 : Test de Tukey pour la concentration en inoculum 10^2 cfu/ml

A la concentration en inoculum de 10^2 cfu/ml, les résultats obtenus avec le témoin et avec la concentration en HE 0.01% ne sont pas significativement différents. Les résultats obtenus avec les concentrations en HE 0.02% et 0.04% sont significativement différents entre eux et en comparaison aux autres concentrations testées.

Le développement de *R. solanacearum* n'est pas inhibé aux concentrations en HE 0.01 et 0.02% ; l'inhibition est totale à partir de la concentration en HE 0.04% (figure 10).

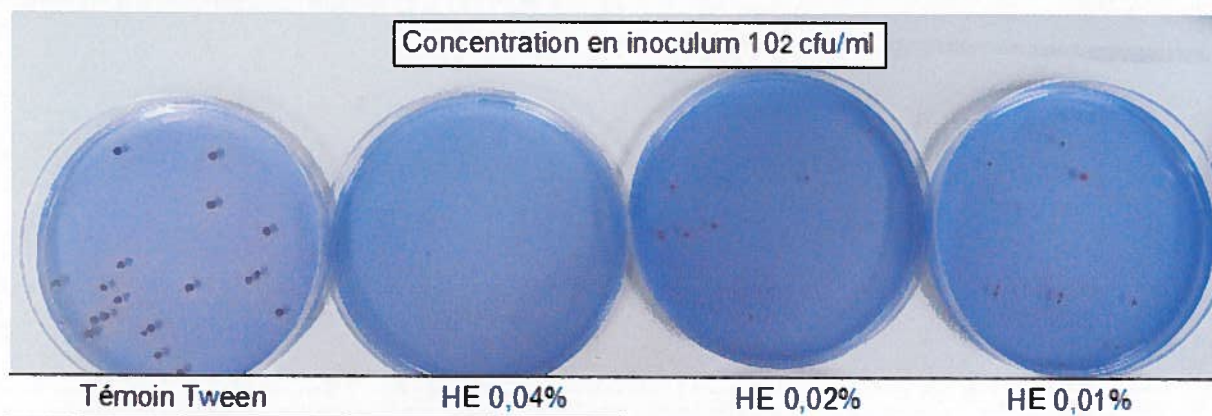


Figure 10 : Photo de colonies de *R. solanacearum* sur milieu amendé ou non en HE ;
Inoculum calibré à 10^2 cfu/ml

1.2- Essai 1.2

81% de la variabilité exprimée est expliquée par le modèle (ANOVA, $R^2=0.81$). L'analyse de variance ANOVA montre un effet significatif de la concentration en HE testée et de la concentration en inoculum (ANOVA, $p<0.01$) (tableau 4).

Source	DDL	Σ des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F	Différence significative
série	2	0.038	0.019	0.151	0.860	Non
Répétition	2	0.203	0.102	0.799	0.453	Non
Concentration en HE	3	24.131	8.044	63.275	< 0.0001	Oui
Concentration de l'inoculum	2	28.679	14.340	112.804	< 0.0001	Oui

Tableau 4 : Résultat de l'analyse de variance ANOVA

L'effet « série » n'étant pas significatif, les résultats des trois séries sont regroupés (tableau 5). Les traitements, pour chacune des trois concentrations en inoculum, se distinguent en trois groupes statistiquement différents (Test de Tukey, $p<0.05$). Le tableau 6 présente les résultats du test de comparaison multiple de Tukey pour la concentration en inoculum de 10^3 cfu/ml.

Inoculum (CFU/mL)	Concentration en HE			Témoin Tween
	0,02	0,03	0,04	
Répétition 1				
10 ³	76,33333	50	0	94,33333
10 ²	10,66667	5,66667	0	10,33333
10 ¹	0,33333	1	0	0,66667
Répétition 2				
10 ³	100,6667	67	0	92
10 ²	39,66667	6	0	16,33333
10 ¹	0,33333	2	0	2
Répétition 3				
10 ³	104,3333	68,33333	0	92,33333
10 ²	11,66667	5,66667	0	11
10 ¹	1,33333	0,66667	0	1

Tableau 5: Valeur du nombre de cfu,
pour chaque concentration en HE,
par répétition et par concentration en inoculum

Concentration en HE	Moyenne estimée	Groupes
0	1,993	A
0,02	2,005	A
0,03	1,790	B
0,04	0,000	C

Tableau 6 : Test de Tukey pour la
concentration en inoculum
10³cfu/ml

A la concentration en inoculum de 10³ cfu/ml, les résultats obtenus avec le témoin et la dose 0.02% ne sont pas significativement différents. Les résultats obtenus avec les doses 0.03% et 0.04% sont significativement différents entre eux et en comparaison aux autres concentrations testées.

Jusqu'à la dose en HE 0.03% le développement de *R. solanacearum* n'est pas inhibé ; à la dose en HE 0.04%, l'inhibition est totale (figure 11). La CMI (concentration minimale d'inhibition) déterminée ici est de 0.04% en HE.

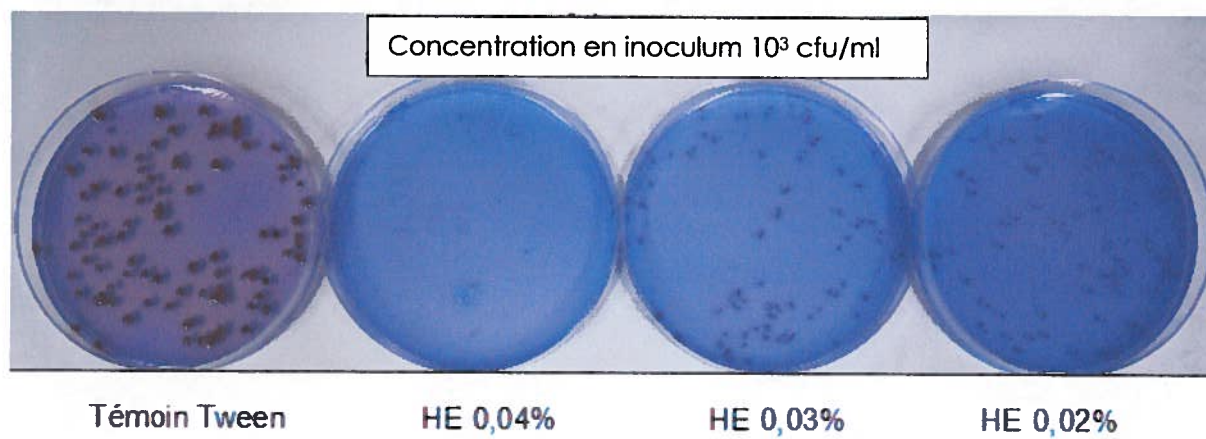


Figure 11: Photo de colonies de *R. solanacearum* sur milieu amendé ou non en HE;
Inoculum calibré à 10³ cfu/ml

Remarque : L'observation à l'œil nu des colonies de *R. solanacearum* sur boîtes de pétri, permet de constater que les colonies de *R. solanacearum* sont plus volumineuses sur les boîtes témoins sans HE par rapport à toutes les boîtes traitées en HE (figure 11).

B) Essai 2

1) Dynamique des populations de *R. solanacearum* dans le sol

Pour chaque traitement, les effets des répétitions (5 sacs) et des séries (dilutions) ne sont pas significatifs (Tableau 7). A J59, 93.6% de la variabilité est expliquée par le modèle (ANOVA, $R^2=0.936$). Les données de l'ensemble des répétitions et séries sont regroupées pour réaliser l'analyse statistique (figure 12).

Source	DDL	Σ des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F	Différence significative
Répétition (sac)	4	1.478	0.369	1.007	0.419	Non
Série (boîte de pétri)	1	0.122	0.122	0.334	0.568	Non
Concentration en HE	3	165.190	55.063	150.070	< 0.0001	Oui

Tableau 7 : Résultat de l'analyse de variance ANOVA, en fin d'essai, à J59

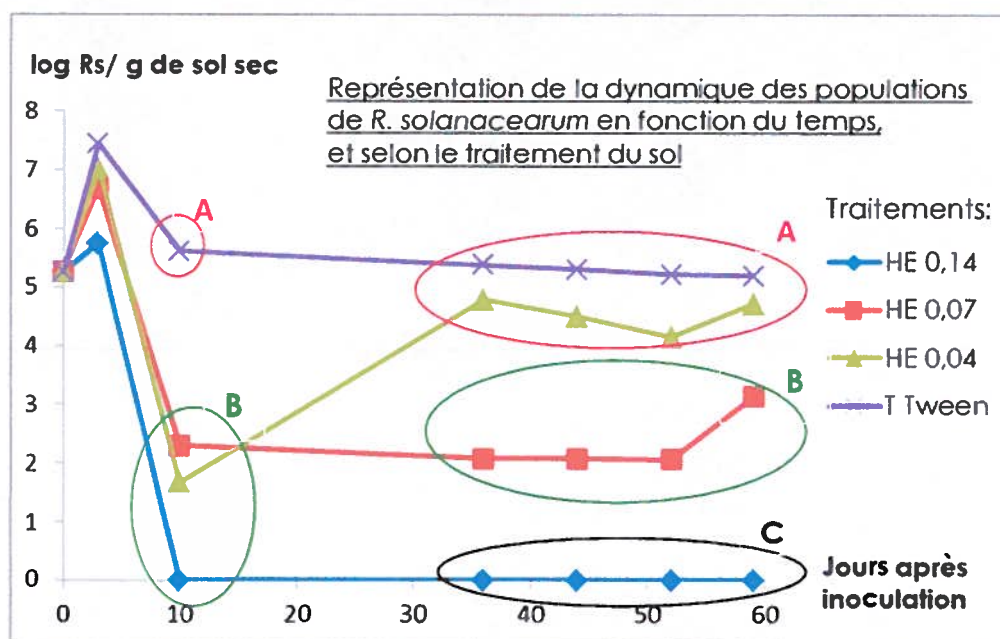


Figure 12: Suivi de la dynamique des populations de *R. solanacearum*, pendant 59 jours, en sols amendés avec différentes concentrations en HE de bois d'inde.
A, B, C : groupes statistiques (test de Tukey)

Pour tous les traitements on constate une augmentation marquée des populations de *R. solanacearum* durant les trois premiers JAI. Puis entre le troisième et le dixième JAI, une diminution est observée pour tous les traitements et celle-ci est d'autant plus forte que la dose en HE est élevée. La population de *R. solanacearum* dans le sol témoin devient alors significativement supérieure à celle des sols ayant reçu des HE. Les traitements en HE ont un effet suppressif sur les populations de *R. solanacearum* à partir du troisième JAI.

A partir du 10^{ème} jour, pour le traitement témoin, on observe que la population de *R. solanacearum* se maintient durant les 59 jours de suivi.

Pour les sols traités en HE, on observe une évolution des populations de *R. solanacearum* différente selon la dose en HE.

En effet, après une chute marquée du nombre de bactéries entre le 3^{ème} et le 10^{ème} JAI, la population de *R. solanacearum* augmente fortement, pour le traitement en HE 0.04%, et se maintient à un seuil proche de celui des populations du sol témoin.

Pour le traitement en HE 0.07, la population de *R. solanacearum* se maintient un taux plus de fois inférieur au témoin puis augmente au 57^{ème} JAI.

Pour le traitement HE 0.14%, la population de *R. solanacearum* est indétectable à partir du 10^{ème} JAI.

Ces observations se confirment statistiquement (ANOVA, $p < 0.01$), dès 36 JAI, trois groupes statistiques se distinguent (test de Tukey, $p < 0.05$). Le traitement HE 0.04% n'est pas significativement différent du traitement témoin. Les traitements HE 0.07 et 0.14% sont différents entre eux et avec le témoin et le traitement HE 0.04%. Le résultat du test de Tukey au 59^{ème} jour est présenté dans le tableau 8. Il y a donc un effet inhibiteur du traitement en HE sur les populations de *R. solanacearum* dès la dose 0.07%, et l'inhibition est totale à la dose en HE 0.14%.

Traitement	Moyenne estimée	Groupes
témoin	5.196	A
HE 0.04%	4.719	A
HE 0.07%	3.134	B
HE 0.14%	0.000	C

Tableau 8 : Test de Tukey à J59

2) Dynamique des populations bactériennes totales dans le sol

Pour chaque traitement, les effets des répétitions (5 sacs) et des séries (dilutions) ne sont pas significatifs (Tableau 9). A J59, 76.4% de la variabilité exprimée est expliquée par le modèle (ANOVA, $R^2 = 0.764$). Les données de l'ensemble des répétitions et séries sont regroupées pour réaliser l'analyse statistique (figure 13).

Source	DDL	Σ des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr>F	Différence significative
Répétition (sac)	1	0.245	0.245	5.078	0.031	Non
Série (dilution)	1	0.122	0.122	0.334	0.568	Non
Concentration en HE	3	5.202	1.734	32.345	< 0.0001	Oui

Tableau 9 : Résultat de l'analyse de variance ANOVA, en fin d'essai à J59

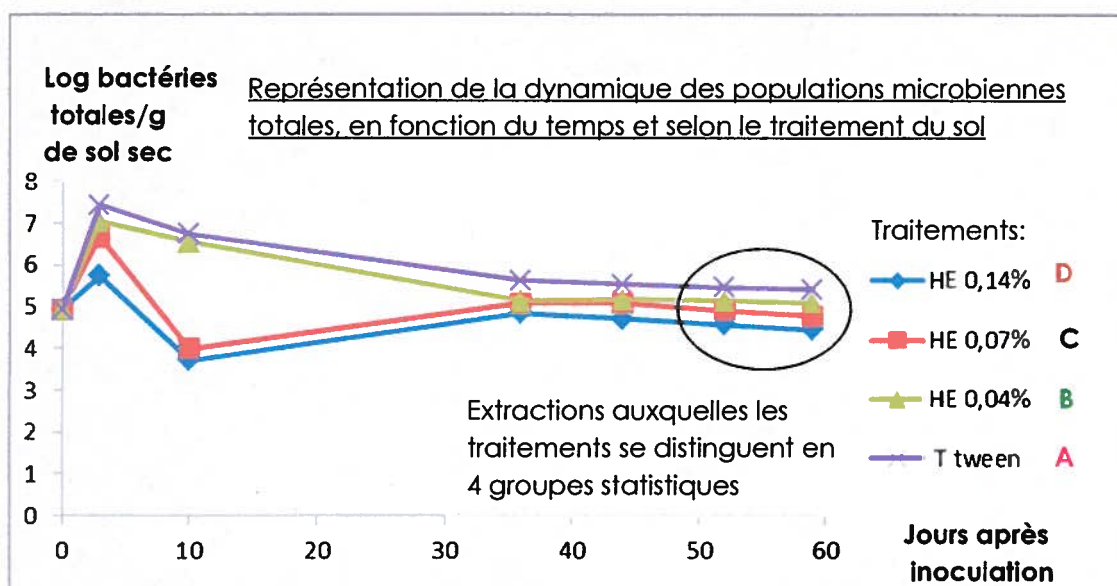
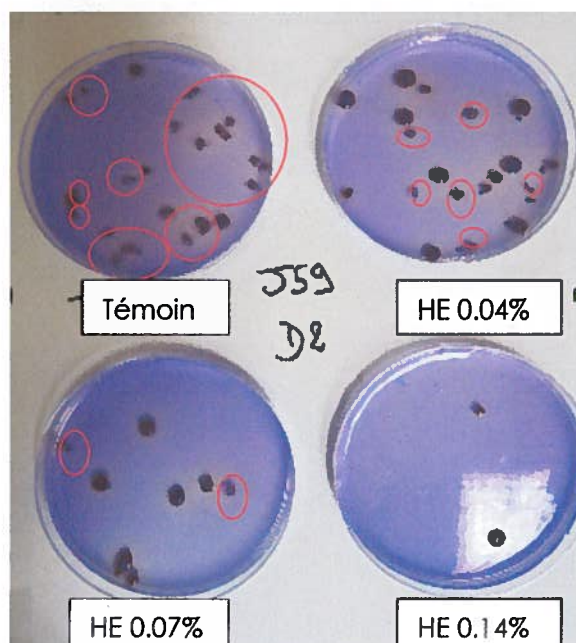


Figure 13 : Suivi de la dynamique des populations bactériennes totales, pendant 59 jours, en sols amendés avec différentes concentrations en HE de bois d'inde.
A, B, C, D : groupes statistiques du test de Tukey à J52 et J59

Le nombre de bactéries totales (*R. solanacerum* et autres), à 59 JAI, est significativement différents entre tous les traitements (tableau 10). Plus la concentration en HE augmente et plus le nombre de CFU totale est faible.

Pour les traitements en HE 0.07 et 0.14%, on observe une diminution marquée des populations bactériennes totales entre le 3^{ème} et le 10^{ème} jour après inoculation.

L'amendement du sol en HE a également un effet inhibiteur du développement des colonies bactériennes autres que *R. solanacearum*, la figure 14 illustre ce résultat.



Traitement	Moyenne estimée	Groupes
Témoin	5,422	A
HE 0.04%	5.104	B
HE 0.07%	4.777	C
HE 0.14%	4.456	D

Tableau 10 : Test de tukey à J59

Figure 14: Colonies bactériennes totales extraites du sol, à 59 JAI, pour chaque traitement.

Les colonies de *R. solanacearum* sont encerclées en rouge

C) Essai 3

Les données obtenues pour l'essai 3, l'incidence de flétrissement bactérien (IFB), les valeurs AUDPC et les indices de colonisation (IC) ne suivent pas une distribution selon la loi Normale (test de Shapiro-Wilk, $p < 0.05$). On ne peut alors pas réaliser de tests paramétriques d'analyse de variance ANOVA et de comparaison multiple de Tukey.

Les données ne sont donc pas appuyées par des tests statistiques, mais sont présentées ci-dessous, en regroupant les 3 blocs, afin de montrer la tendance qui se dégage.

1) Incidence du flétrissement bactérien (figure 15)

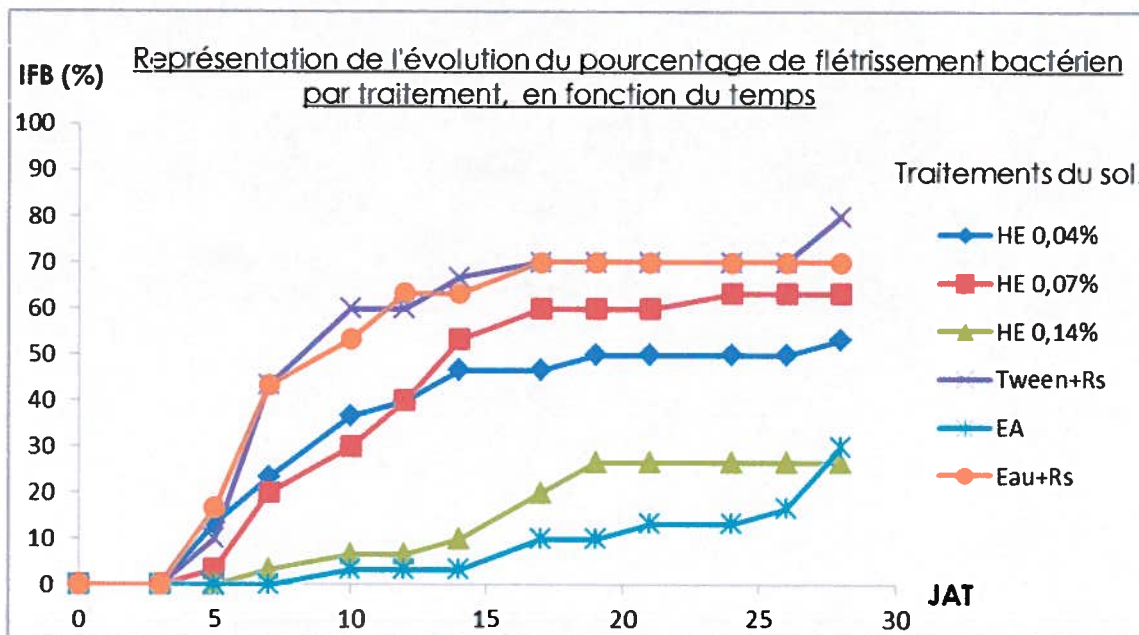


Figure 15: Représentation de l'évolution du flétrissement bactérien pendant 28 jours, selon le traitement, en regroupant les 3 blocs

Les symptômes du flétrissement bactérien apparaissent dès le cinquième jour après transplantation.

Un plant/30 du traitement eau non inoculé présente des symptômes du flétrissement bactérien, tandis que tous les autres plants sont restés sains tout au long de la période expérimentale. L'isolement microbiologique sur ce plant confirme la présence de *R. solanacearum* phylotype II.

Pour les traitements témoins inoculés (Tween et eau) et les traitements en HE 0.07% et 0.04%, le développement du flétrissement bactérien (IFB) est très rapide durant les 17 premiers JAT, puis l'IFB atteint un plateau. En fin d'essai, à 28JAT, l'IFB atteint 70 et 80% pour les témoins inoculés (eau et Tween), et 53 et 63% pour les traitements en HE, 0.04 et 0.07% respectivement.

Pour les traitements EA 50% et HE 0.14%, l'expression de la maladie est freinée jusqu'au 14ème JAT. Pour le traitement HE 0.14%, l'IFB augmente à partir de 14 JAT et atteint un plateau ; En fin d'essai, à 28 JAT, l'IFB est de 26%. Pour le traitement EA 50%, l'IFB augmente à partir du 14ème JAT et l'IFB atteint 30% en fin d'expérimentation.

La figure 16 illustre l'observation progressive de la diminution du nombre de plant flétris avec les concentrations en HE élevées.

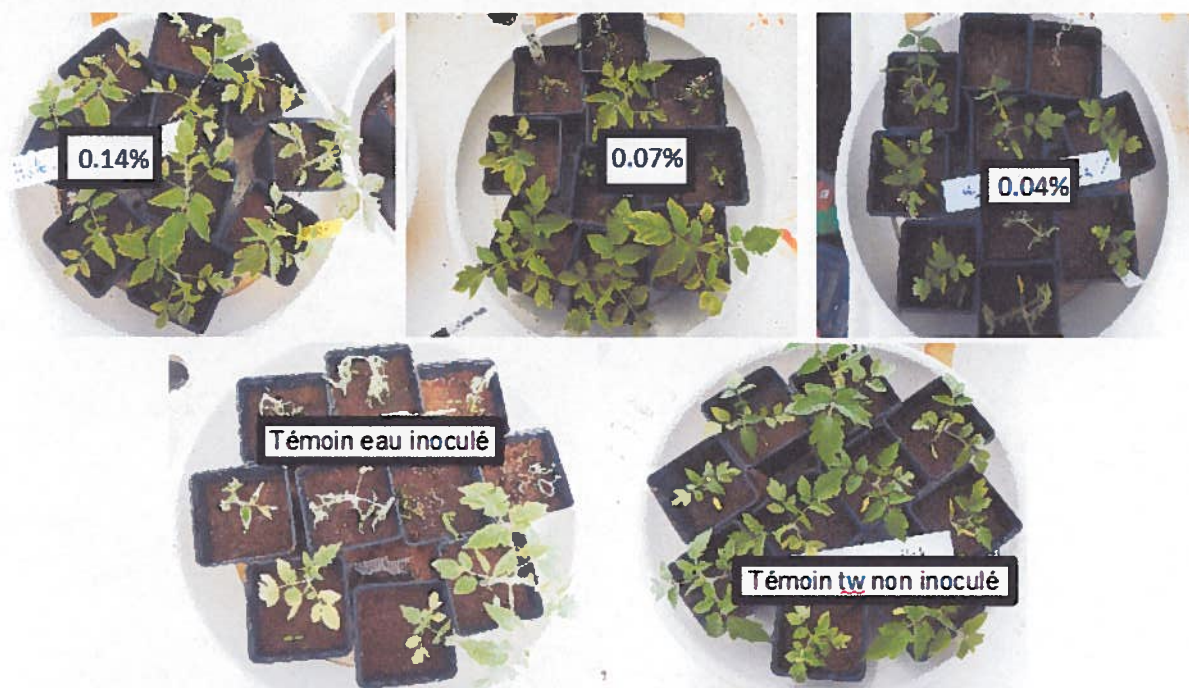


Figure 16: Plants de traitement HE 0.14%, HE 0.07% , HE 0.04%, témoin inoculé et non inoculé (de haut en bas et de gauche à droite)

2) Sévérité du flétrissement bactérien :

La sévérité de la maladie est évaluée grâce aux valeurs AUDPC, calculées pour chaque traitement et chaque date.

En fin d'essai, les traitements semblent se distinguer en deux groupes. Les traitements HE 0.04%, HE 0.07%, témoin Tween inoculé et témoin eau inoculé, dont la valeur d'AUDPC est supérieur ou égale à 10 ; Et les traitements HE 0.14%, témoin Tween non inoculé, EA 50% et témoin eau non inoculé, dont la valeur AUDPC est inférieure à 10 (figure 17).

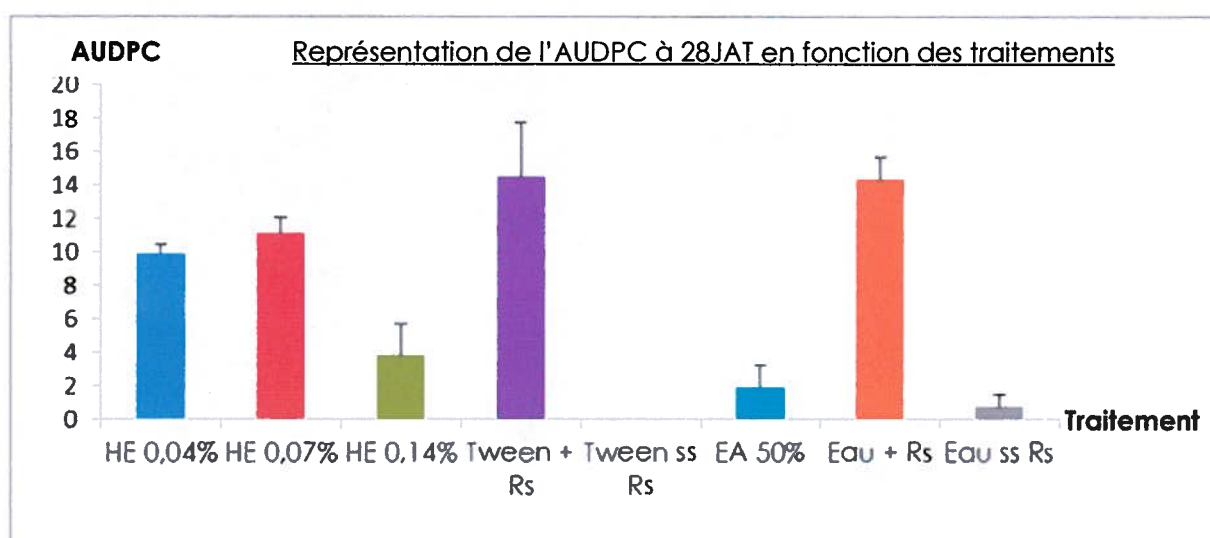


Figure 17: Représentation des AUDPC à 28JAT pour chaque traitement
Les barres d'erreurs indiquent les erreurs standards des moyennes

3) Indice de colonisation bactérienne (IC)

Quelques plants sans symptômes présentent une infection latente. Les groupes qui semblent se distinguer sont les mêmes que ceux des IFB et AUDPC obtenus en fin d'expérimentation (figure 18).

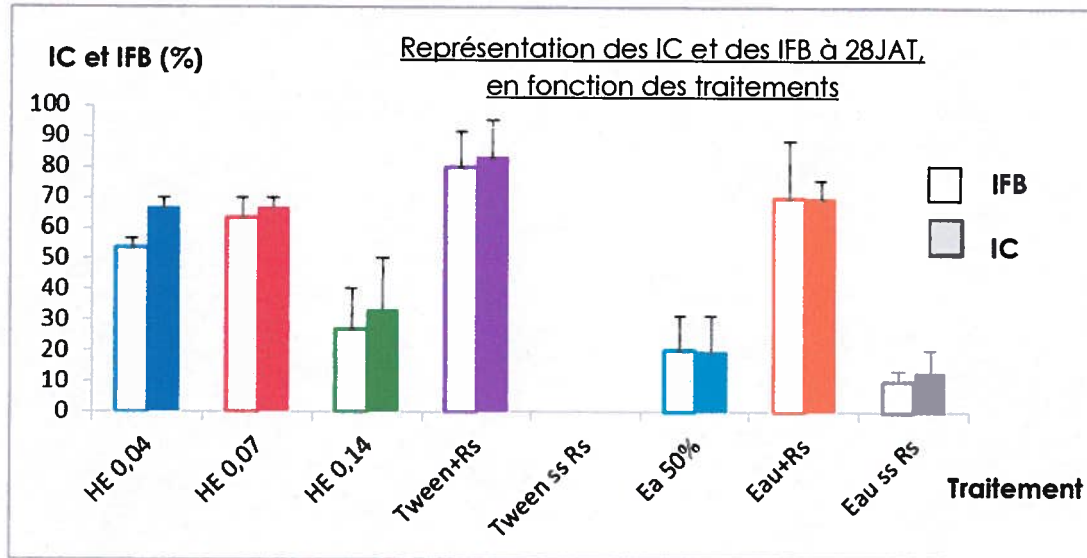


Figure 18: Représentation des IFB et IC en fin d'essai, à 28 JAT, pour chaque traitement. Les barres d'erreurs indiquent les erreurs standards des moyennes

4) Cas du traitement en extrait aqueux

Les plantes du traitement EA 50% ont développé d'une morphologie particulière, avec un port dressé et un jaunissement foliaire prononcé (figure 19).

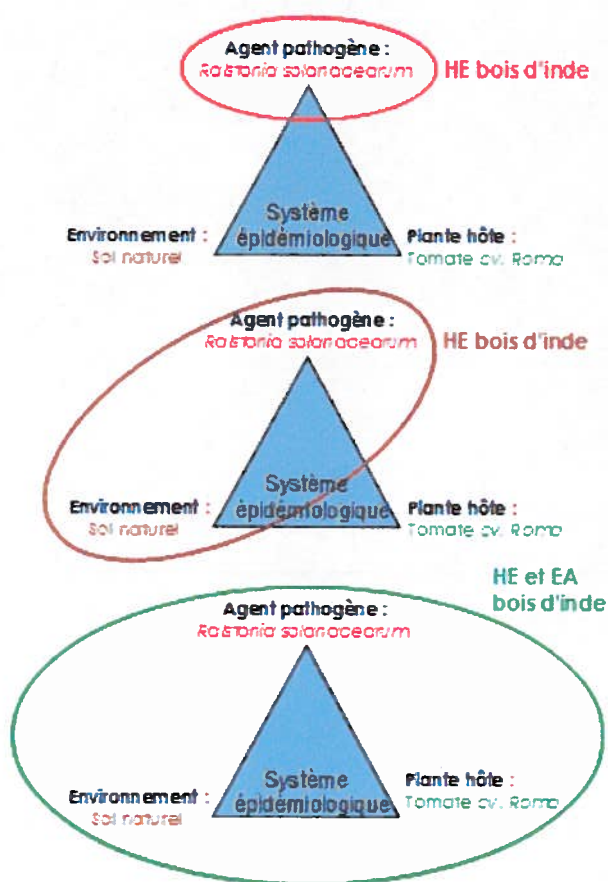
En fin d'essai, l'IFB du traitement EA 50% atteint 30%. Cependant, plus de la moitié des plants sont morts au cours de l'expérimentation, de cause extérieure au flétrissement bactérien. En effet, les isollements microbiologiques réalisés sur ces plants n'ont pas permis d'isoler *R. solanacearum*.



Figure 19 : Photo de plant de tomate témoin (gauche) et ayant reçu le traitement EA (droite)

III) Discussion

Les essais réalisés dans le cadre de mon stage s'inscrivent dans la thématique de recherche sur la gestion agroécologique du flétrissement bactérien de la tomate. Nous avons testé l'effet antibactérien d'extraits de bois d'inde (*Pimenta racemosa*) contre l'agent pathogène *R. solanacearum*, en prenant en compte le complexe épidémiologique responsable du flétrissement bactérien de la tomate. Ce complexe est constitué de l'agent pathogène, la plante hôte et l'environnement (figure 20). Notre approche a consisté à réaliser dans un premier temps, une étude *in vitro* ciblée sur l'agent pathogène puis, dans un second temps, deux études complémentaires *in vivo* amenant progressivement à intégrer la globalité du triangle épidémiologique de la maladie.



Essai 1 : Etude *in vitro* de l'effet de l'HE de Bois d'Inde sur l'agent pathogène *R. solanacearum*. Etude ciblée sur l'agent *R. solanacearum*.

Essai 2 : Effet de l'HE de bois d'inde sur la dynamique des populations de *R. solanacearum* dans un sol naturel. Intégration de la composante environnementale, « sol naturel ».

Essai 3 : Effet de l'HE et EA de bois d'inde sur l'incidence du flétrissement bactérien de la tomate. Intégration des composants « sols naturels » et plante hôte

Figure 20: Etude de l'effet antibactérien d'extraits de bois d'inde intégrant les différentes composantes du système épidémiologique du flétrissement bactérien

L'essai 1, *in vitro*, a permis de valider l'effet antibactérien de l'HE de bois d'Inde sur l'agent pathogène *R. solanacearum*, et de déterminer la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) dans nos conditions expérimentales. L'HE de bois d'inde à la concentration 0.04% inhibe la croissance de *R. solanacearum*, sur milieu gélosé nutritif, en conditions optimales de croissance.

On a également observé un effet de l'HE sur la morphologie des colonies de *R. solanacearum*, avec la présence de colonies de plus petite taille en présence de l'HE de bois d'inde.

Ces résultats ont déjà été montrés dans la littérature avec d'autres extraits végétaux testés sous forme d'HE. Paret *et al* (2010), par cette même méthode, ont montré un effet antibactérien d'HE de palmarosa (*Cymbopogon martini*) et de citronnelle (*Cymbopogon citratus*) contre *R. solanacearum*. De plus, l'effet antibactérien de certaines HE a été montré spécifique à une espèce bactérienne. Par exemple, l'HE de feuilles de *Spirea Alpina* n'a aucun effet sur l'agent bactérien *Xanthomonas campestris* (pathogène de la tomate) alors qu'elle inhibe le développement de *R. solanacearum* (Teng *et al*, 2009).

D'autres types d'extraits ont également montré un pouvoir inhibiteur sur le développement *in vitro* d'espèces bactériennes phytopathogènes de la tomate, comme les extraits aqueux de figue et d'ail (Balestra *et al*, 2009). Récemment, une étude réalisée à la Martinique, a montré l'effet antimicrobien d'extrait aqueux d'*Allium fistulosum*, avec réduction significative du flétrissement bactérien sur tomate (Deberdt *et al*, 2012). Cependant, les EA ont été efficaces à 50%, ce qui suggère l'apport de quantité de biomasse très élevée. Ainsi, l'EA d'*Allium fistulosum* apparaît difficilement applicable en conditions au champ. L'HE de bois d'inde utilisée dans cette étude présente l'avantage de pouvoir être utilisée à concentration très faible.

Les essais *in vivo*, 2 et 3, sont une avancée vers l'étude du fonctionnement d'une parcelle agricole, dans son ensemble. L'effet du traitement en HE est conditionné par la complexité d'un milieu, résultat d'interactions entre les différents acteurs biotiques, microorganismes et végétaux, et abiotiques. Afin de s'affranchir de trop grandes variations des paramètres environnementaux, les essais sont réalisés en conditions semi-contrôlées, en chambre climatique et en serre.

L'essai 2 a permis de réaliser le suivi de la dynamique des populations de l'agent *R. solanacearum* dans un sol naturellement infesté et artificiellement contaminé, après traitement avec les HE de bois d'inde. Cette étude a montré que l'HE a un effet biocide (effet direct) sur l'agent bactérien *R. solanacearum* dans son milieu naturel.

La cinétique de la dynamique des populations dans le sol montre que l'HE a un effet antibactérien sur *R. solanacearum* dès le 3^{ème} jour après traitement du sol, pour les trois concentrations en extrait testées. L'effet est d'autant plus marqué que la concentration en HE est élevée.

Les populations bactériennes évoluent différemment selon les traitements durant les 59 jours de suivi. Ainsi, si le traitement en HE à la plus faible concentration, 0.04%, montre un effet antibactérien durant les 10 premiers jours, cet effet s'estompe rapidement, 10 jours après traitement du sol. A la concentration en HE 0.04%, la réduction de l'effectif de *R. solanacearum* n'est pas suffisante pour stopper durablement la multiplication de la bactérie. On peut supposer qu'à cette concentration en HE, la quantité de molécules actives n'est pas suffisante pour maintenir l'effet antibactérien au delà de 10 jours. On peut également attribuer cela au caractère volatile des composés actifs contenus dans l'HE. En effet, une proportion non négligeable des molécules a pu s'échapper durant les manipulations (préparation des extraits, traitement du sol, extraction) ou le stockage, en sac fermé non hermétiquement.

A la concentration en HE 0.07%, une forte diminution de la population de *R. solanacearum* est également observée au cours des 10 premiers jours, puis les populations de *R. solanacearum* sont maintenues à faible densité, à un taux significativement plus faible que celui du témoin, et ceci pendant 52 jours. Cependant, la multiplication bactérienne semble reprendre au bout de 52 jours. La population de *R. solanacearum* est capable de reprendre

sa croissance. Il serait intéressant de continuer ce suivi sur une plus longue durée, afin de voir si cette tendance se maintient, ou bien si le développement bactérien continu.

A la concentration en HE 0.14%, plus aucune colonie de *R. solanacearum* n'est observée dès le 10ème jour après traitement du sol. A cette dose la bactérie n'est plus capable de se développer sur milieu de culture, après extraction du sol, et ceci pendant les 59 jours de suivi. Les résultats montrent clairement l'effet antibactérien de l'HE à 0.14% pendant 59 jours ; il serait intéressant de réaliser le suivi des populations de *R. solanacearum*, à intervalles réguliers, sur une plus longue période, afin de connaître la durée maximale d'action biocide de l'HE à 0.14%.

Il serait intéressant de déterminer s'il existe une concentration seuil d'amendement en extrait végétal à laquelle *R. solanacearum* n'est plus capable de reprendre une multiplication normale, et ceci au-delà de 59 jours après traitement du sol. Cette question peut être étudiée par répétition de cet essai, sur une période plus longue et avec des traitements en HE de concentrations comprises entre 0.07 et 0.14%. Si cette concentration seuil existe, elle pourra faire partie des combinaisons à mettre en place pour le contrôle du flétrissement bactérien en plein champ.

Les conditions expérimentales testées ici ne permettent pas la transposition directe des conclusions aux parcelles agricoles. En effet, dans un sac, si la population de *R. solanacearum* est éliminée, elle a moins de chance de réapparaître en comparaison aux conditions naturelles de plein champ. En conditions naturelles, la bactérie peut être réintroduite, par divers éléments (plantes présentant une infection latente, utilisation de matériel agricole non désinfecté ou de semences non stériles), et recoloniser le milieu.

Parallèlement, on observe également un effet de l'HE sur la flore bactérienne tellurique totale, celle-ci est significativement plus faible à mesure que la concentration en HE augmente. Ce résultat montre un impact de l'HE sur la diversité microbienne. Ainsi, on peut également supposer un effet de l'extrait végétal sur d'autres microorganismes, pathogènes ou non, vivant dans le sol. Ces questions sont essentielles à la compréhension globale de l'effet de cet extrait végétal. L'apport d'un nouvel acteur dans l'écosystème, l'extrait végétal, entraîne sans aucun doute des modifications, en perturbant les équilibres établis. Il est nécessaire de poursuivre cette étude avec des essais permettant de mieux comprendre l'effet de l'HE de bois d'inde sur les communautés microbiennes du sol.

Cependant, la capacité de *R. solanacearum* à entrer dans un état VBNC nous oblige à pondérer les résultats obtenus. En effet, l'existence de cette forme de résistance suggère que, pour déterminer l'efficacité d'un traitement, l'utilisation de méthode de détection sur milieu de culture n'est pas suffisante car ne permet pas de déceler toutes les bactéries viables (Grey and Steck, 2000). Ainsi, à la concentration en HE 0.14%, bien qu'aucune colonie de *R. solanacearum* ne se soit développée pendant 59 jours, on ne peut pas affirmer l'absence totale de colonies de *R. solanacearum* vivantes dans le sol.

L'essai 3 a montré un effet suppressif de l'HE de bois d'inde sur le flétrissement bactérien de la tomate, par observation directe des symptômes sur la tomate. Le traitement en HE 0.14% a réduit de 65% l'incidence de la maladie par rapport au témoin inoculé. D'après les essais précédents on peut dire que ceci est dû à l'effet biocide de l'HE, mais on ne peut cependant pas exclure l'implication d'autres mécanismes d'action, tel que l'effet inducteur de l'HE sur les mécanismes de défenses naturelles de la plante.

Les résultats et observations du traitement en EA peuvent être expliqués par un effet phytotoxique de l'EA.

D'autres modes d'application des extraits végétaux ont été rapportés dans la littérature, et pourraient être envisagés ici ; il s'agit de la pulvérisation foliaire (Balestra et al,

2009), moins adaptée dans le cas d'un agent bactérien tellurique, ou encore le trempage des graines dans l'extrait végétal avant semis (Abdel-Monaim *et al*, 2010). Le dépôt de l'extrait en solution à la surface du sol, à la base de la plante, ou bien le goutte à goutte semblent plus adaptés pour une application au champ, vis à vis d'agents telluriques. En Floride, l'application de thymol en prétraitement par la méthode de goutte à goutte a montré un effet protecteur contre le flétrissement bactérien de la tomate (Pingsheng *et al*, 2007).

Suite à ces résultats encourageants, il serait intéressant de déterminer la composition biochimique des extraits d'HE de bois d'inde. Ceci dans le but d'identifier la ou les molécules actives, responsables de l'effet recherché, et de les synthétiser. En Floride, la synthèse de thymol, molécule active du Thym, a permis de réduire le flétrissement bactérien de la tomate en plein champ (Ji *et al*, 2005).

IV) Conclusion

L'étude réalisée a permis de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'HE de Bois d'Inde (*Pimenta racemosa*) sur l'agent pathogène *R. solanacearum*, en conditions expérimentales *in vitro* et *in vivo* dans un sol naturel. Ces résultats offrent une perspective intéressante vers la conception d'un système de gestion intégrée du flétrissement bactérien. L'utilisation d'HE de bois d'Inde pourrait être associée à d'autres méthodes de lutte combinant des mesures prophylactiques et des pratiques culturales innovantes. Cette étude est donc à poursuivre, par des essais en conditions contrôlées permettant tout d'abord de valider nos premiers résultats mais aussi en plein champ, en testant différentes modalités d'application en extrait végétal. Il faudra prendre en compte également la faisabilité de ces techniques par rapport aux contraintes et habitudes des agriculteurs.

Bibliographie

- Abdel-Monaim M.F., Abo-Elyousr K.A.M., Morsy K.M., 2010. Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt disease of lupine (*Lupinus termis* Forsik). *Crop Protection*, 30: 185-191.
- Abo-Elyousr K.A.M., Asran M. R., 2009. Antibacterial activity of certain plant extracts against bacterial wilt of tomato. *Phytopathology and Plant Protection*, 42(6) : 573-578.
- Balestra G.M., Rossetti A., Quattrucci A., 2008. Biological control of kiwifruit and tomato bacterial pathogens. 16th IFOAM Organic World Congress.
- Balestra G.M., Heydari A., Ceccarelli D., Ovidi E., Quattrucci A., 2009. Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. *Crop Protection*, 28: 807-811.
- Digat B., Escudié A., 1967. Reconnaissance du flétrissement bactérien des Solanacées aux Antilles Françaises. *Phytiatr. Phytopharm*, 16 : 187-197.

Deberdt P., Perrin B., Coranson-Beaudu R., Duyck P.F., Wicker E., 2012. Effect of *Allium fistulosum* Extract on *Ralstonia solanacearum* Populations and Tomato Bacterial Wilt. Plant Dis, 96: 687-692.

Denny T.P., Plant Pathogenic *Ralstonia* Species, 2006. In: Plant-Associated Bacteria, Gnanamanickam S.S., p.573-644, Springer, Chennai, India.

Fegan M., Prior P., 2005. How Complex is the "*Ralstonia solanacearum* Species Complex"? In: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia Solanacearum* Species Complex. Allen C., Prior P., Hayward A.C., p.449-461, APS PRESS, Minesota U.S.A.

Felix R., Eliazar O.M., Onyango O.J., 2010. Assessment of Irish Potato Cultivars' Field Tolerance to Bacterial Wilt (*Ralstonia solanacearum*) in Kenya. Plant Pathology Journal, 9 : 122-128.

Freitas P.C., Nascimento G.G.F., Locatelli J., Silva G.L., 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. Brazilian Journal of Microbiology, 31:247-256.

Gauthier M.J., 2000. Environmental parameters associated with the viable but nonculturable state. In: Nonculturable microorganism in the environment. Colwell R.R., Grimes D.J., p.87-112, ASM Press, Washington D.C.

Granada G.A., Sequeira L., 1983. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere and plant roots. Canadian Journal of Microbiology, 29: 433-440.

Grey B.E., Steck T.R., 2001. The Viable But Nonculturable State of *Ralstonia solanacearum* May Be Involved in Long-Term Survival and Plant Infection. Applied and Environmental Microbiology, 3866-3872.

Hunter P., 2009. Fight fire with fire: can biopesticides fill the void left by banning chemical pesticides and herbicides? EMBO report, VOL 10, NO 5.

Ji P., Momol M. T., Olson S. M., Pradhanang P. M., and Jones J. 2005. Evaluation of thymol as biofumigant for control of bacterial wilt of tomato under field conditions. Plant Dis. 89:497-500.

Jijakli M.H., 2003. La lutte biologique en phytopathologie. In : Phytopathologie Lepoivre P., p. 289-292, De Boeck & Larcier S.A., Bruxelles.

Laure A. Evaluation *in vitro* de l'effet antimicrobien d'extraits végétaux sur la croissance de *Ralstonia solanacearum* et étude des mécanismes d'action. BTS Bio-Analyses et Contrôles. Lycée de Bellevue, 2012, 33 pages.

Lebeau A. Résistance de la tomate, l'aubergine et le piment à *Ralstonia solanacearum* : interactions entre les gènes de résistance et la diversité bactérienne, caractérisation et cartographie des facteurs impliqués chez l'aubergine. Discipline : Sciences. La Réunion : Université de la Réunion, 2010, 184 pages.

Mian D., Coranson-Beaudu R., Duféal D., Grassart L., Mention P., 2002. *Ralstonia solanacearum* sur anthurium à la Martinique. Phytoma, La Défense des Végétaux, 551 : 43-45.

Negi P.S., Jyaprakasha G.K., Jena B.S., 2002. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. Food Chemistry, 80: 393-397.

Paret L., Alvarez A.M., Cabos R., Kratky B.A., 2010. Effect of Plant Essential Oils on *Ralstonia solanacearum* Race 4 and Bacterial wilt of Edible Ginger. Plant Dis, 94 : 521-527.

Pingsheng J., Momol M.T., Rich J.R., Olson S.M., Jones J.B., 2007. Development of an Integrated Approach for Managing Bacterial Wilt and Root-Knot on Tomato Under Field Conditions. Plant Dis, 91: 1321-1326.

Pradhanang P.M., Jones J.B., Momol M.T., Olson S.M., 2003. Effects of Plant Essential Oils on *Ralstonia solanacearum* Population Density and Bacterial Wilt Incidence in Tomato. Plant Dis, 87 : 423-427.

Prior P., Steva H., 1990. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from the French West Indies. Plant Dis., 74: 13-17.

Renarzewski A., 2006. La culture de la tomate en Martinique d'après l'enquête phytosanitaire de Renarzewski A.

Teng Y., Hou T., Yang Q., Yu Z., Zhou G., Sun Q., Jin H., 2010. In vitro antibacterial activity of the leaf essential oil of *Spirea alpina* Pall. World J Microbiol Biotechnol, 26 : 9-14.

Vasinauskiene M., Radusiene J., Zitikaite I., Surviliene E., 2006. Antibacterial activities of essential oils from aromatic and medicinal plants against growth of phytopathogenic bacteria. Agronomy Research, 4 : 437-440.

Wicker E., Grassart L., Coranson-Beaudu R., Mian D., Guilbaud C., Fegan M., Prior P., 2007. *Ralstonia solanacearum* Strains from Martinique (French West Indies) Exhibiting a New Pathogenic Potential. Applied and Environmental Microbiology, p. 6790-6801.